

## VARIAȚIA MORFOMETRICĂ, ALOZIMICĂ ȘI mtADN LA POPULAȚIILE DE ALBINE (*APIS MELLIFERA CYPRIA* POLLMAN, 1879) DIN NORDUL CIPRULUI

I. KANDEMİR<sup>1,2</sup>, Marina D. MEIXNER<sup>1,3</sup>, Ayca OZKAN<sup>2</sup>, S.W. SHEPPARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Entomology, Washington State University, Pullman WA USA, E-mail: irfankandemir@hotmail.com

<sup>2</sup>Department of Biology, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, TURCIA

<sup>3</sup>Institut für Bienenkunde, 2 Karl von Frisch Weg, 614440 Oberursel, GERMANIA

### Rezumat

A fost examinată variabilitatea morfometrică, alozimică și mtADN a populațiilor de *Apis mellifera cypria* din nordul Ciprului. Au fost analizate șase populații (40 de colonii), folosind 39 de caractere morfometrice. Au fost testate zonele citocrom B și carboxiloxidaza lui mtADN, pentru profilele enzimelor de restricție Bgl II și Hinf I, precum și polimorfismul lungimii segmentului de restricție Dra I al zonei intergenice CO I-CO II. Regiunea mitocondrială ND2 a fost secvențiată și comparată cu secvențele publicate ale altor subspecii. Un număr suplimentar de 55 colonii din aceleași localități, din care au fost prelevate mostre ulterior, au fost studiate pentru variația alozimică, folosind sisteme de șase enzime. Au fost detectate niveluri foarte joase ale variației alozimice, cu o heterozigozitate medie de  $0,006 \pm 0,005$ . Analizarea tuturor zonelor mtADN a confirmat originea europeană a populațiilor de albine melifere din nordul Ciprului. Profilurile de digestie identificate în nordul Ciprului au fost aceleași cu cele ale albinelor melifere din estul Europei. Zona intergenică CO I-CO II posedă numai secvența Q, iar profilele de digestie corespund haplotipului C1. Analizarea datelor morfometrice plasează, însă, albinele melifere din nordul Ciprului în linia morfologică orientală, împreună cu *A.m. anatoliaca*, *A. m. meda*, *A.m. syriaca* și *A. m. caucasica*. Arborele filogenetic, construit pe baza datelor secvenței ND2, plasează albinele melifere din Cipru în linia mitocondrială C, care include atât linia morfologică C cât și O.

**Cuvinte cheie:** Cipru / variație genetică / *Apis mellifera cypria*

### Introducere

Albina meliferă din Cipru (*A. m. cypria* Pollmann, 1879) este un alt exemplu de subspecie insulară, ca și *A.m. ruttneri* în Malta, *A. m. adami* în Creta, *A. m. sicula* în Sicilia. În mod similar altor subspecii insulare, albinele melifere din Cipru sunt mai mici. Datorită aspectului lor exotic au fost bine primite de apicultori în perioada de început (RUTTNER, 1988).

În studiile sale morfometrice, RUTTNER (1992) a plasat albinele melifere din Cipru în ramura orientală, împreună cu *A.m. anatoliaca*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda* și *A. m. caucasica*. După cum ne putem aștepta datorită poziției geografice, *A. m. cypria* arată la fel ca și vecinele sale. Ea se află la o distanță aproape egală față de *A. m. anatoliaca* (74,6), *A. m. syriaca* (69,8) și *A. m. meda* (87,3). În comparație cu *A. m. anatoliaca*, albinele cipriote sunt mai mici decât cele anatoliene. În legătură cu dimensiunea corpului, ele au trompa și picioarele mai lungi, dar aripile mai scurte. În cadrul ramurii orientale, ele au abdomenul cel mai lung și zvelt (indice St6 84,6). Indicele cubital este deosebit de ridicat la albinele din Cipru (2,72). Cea mai remarcabilă caracteristică a albinelor cipriote este culoarea abdomenului. Albinele din Cipru și Siria au același tip de model coloristic, considerat apropiat de albina egipteană (*A. m. lamarckii*, fost *A. m. fasciata*) (Fratele ADAM, 1983). În ceea ce privește caracteristicile comportamentale, albinele din Cipru sunt foarte asemănătoare cu *A. m. anatoliaca* adică sunt foarte agresive și roiesc ușor (Fratele ADAM, 1983).

În pofida faptului că este o subspecie insulară, *A. m. cypria* are o ridicată variație morfometrică (RUTTNER, 1988). Introducerea recentă de albine melifere din Turcia în nordul Ciprului poate să fi dus la unele modificări morfometrice și ne putem întreba cât de mult au afectat aceste introduceri recente coloniile de albine din nordul Ciprului. Nu există încă studii detaliate privind variația alozimică și genetică la nivel de ADN.

Pentru abordarea în continuare a acestor probleme legate de variația genetică la *A. m. cypria* și de relația acesteia cu linia O, am întreprins o prelevare de mostre amănunțită. În lucrarea de față, comunicăm rezultatele analizelor complete de mtADN, morfometrie și alozimice ale albinelor din Cipru, *A. m. cypria*.

### Materiale și metode

Un total de 40 de colonii au fost supuse prelevării de mostre, în 6 locații din nordul Ciprului. Mostrele au fost păstrate în etanol de 90 °C, în vederea analizei morfometrice și mtADN. Mostre din alte 55 de colonii

au fost colectate din zona muntoasă și congelate, pentru stabilirea variației biochimice la populațiile de albine din nordul Ciprului.

**Analiza morfometrică:** Un număr total de 18 colonii au fost supuse analizei morfometrice. 11-15 lucrătoare per mostră au fost disecate și 39 de caractere morfometrice măsurate, potrivit lui RUTTNER et al. (1978). Majoritatea caracterelor au fost măsurate cu ajutorul unei camere CCD, folosind un program de măsurare morfometrică (MEIXNER și MEIXNER, 1994). Pigmentarea și pilozitatea au fost măsurate cu un microscop de disecție și un micrometru ocular. Analiza statistică a fost realizată cu mostre de referință din baza de date a "Institut für Bienenkunde", Oberursel.

**Analiza alozimelor:** După analiza preliminară, au fost prelevate mostre detaliate, dintr-un număr suplimentar de 55 de colonii din zona montană, în vederea stabilirii variației alozimice. A fost utilizată variabilitatea în șase sisteme de enzime (*Pgm-1* și *Pgm 2*, *Hk*, *Mdh*, *Me*, *Est* și *Pgi*), așa cum s-a descris mai sus (KANDEMIR și KENCE, 1995). Frecvențele genelor, sumarul parametrilor variației genetice și devierile de la echilibrul Hardy-Weinberg au fost stabilite prin folosirea programului BIOSYS-1 (SWOFFORD și SELANDER, 1981).

**Analiza ADN:** Acizii nucleici totali au fost extrași din 40 de colonii conform metodelor descrise de SHEPPARD și McPHERON (1991), urmând protocolul pentru extracția fenol-cloroform, pus la punct pentru o cantitate mare de mtADN circular intact. Extractele de ADN au fost depozitate la  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pentru analiza mtADN, regiunile intergenice *COI*, *Cyt* și *COI-COII* au fost amplificate prin reacția în lanț a polimerazei și digerate cu *Hinf-I*, *Bgl II* respectiv *Dra-I*, urmând recomandările producătorului (Tabelul I). Fragmentele de gel pentru digestiile cu *Hinf-I* și *Bgl II* au fost separate pe un gel de agaroză 2,5%, constând din 1% agaroză standard BIO-RAD și 1,5% agaroză Nu-Sieve. Fragmentele de digestie restrictivă *Dra-I* au fost separate pe geluri de poli-acrilamidă 10% și 7,5%. Ulterior, gelurile au fost colorate cu bromură de etidiu și fotografiate în UV pentru documentare.

Tabelul I

## Regiunile mtADN, perechile primare și enzimele de restricție utilizate

Regiunile	Perechile primare	Enzima de restricție	Referințe
COI-F COI-R	5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3' 5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3'	<i>Hinf-I</i>	Sheppard et al., 1994
<b>Cyt B- F</b> Cyt B- R	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'	<i>Bgl-II</i>	Sheppard et al., 1994
COI-COII- E2 COI-COII-H2	5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' 5'-CAATATCATTGATGACC-3'	<i>Dra-I</i>	Garnery et al., 1993
ND2-ILE ND2-L1	5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3' 5'-GAATCTAATTAATAAAAAA-3'		Arias and Sheppard, 1996

## Rezultate

**Morfometrie:** Rezultatele preliminare au arătat că albinele din Cipru fac parte din ramura orientală. Toate mostrele din Cipru au fost grupate împreună cu subspeciile *anatoliaca*, *syriaca* și *caucasica*. *A. m. lamarckii* a fost subspecia cea mai apropiată de acest "cluster" (Figura 1).

**Alozime:** Din cele șase enzime testate pentru variația biochimică, patru au fost evidențiate ca polimorfice la populațiile de albine din nordul Ciprului. Toate sistemele enzimatică se găseau în echilibrul Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ). Heterozigozitatea totală pentru albinele din nordul Ciprului a fost calculată ca fiind  $0,006 \pm 0,005$ .

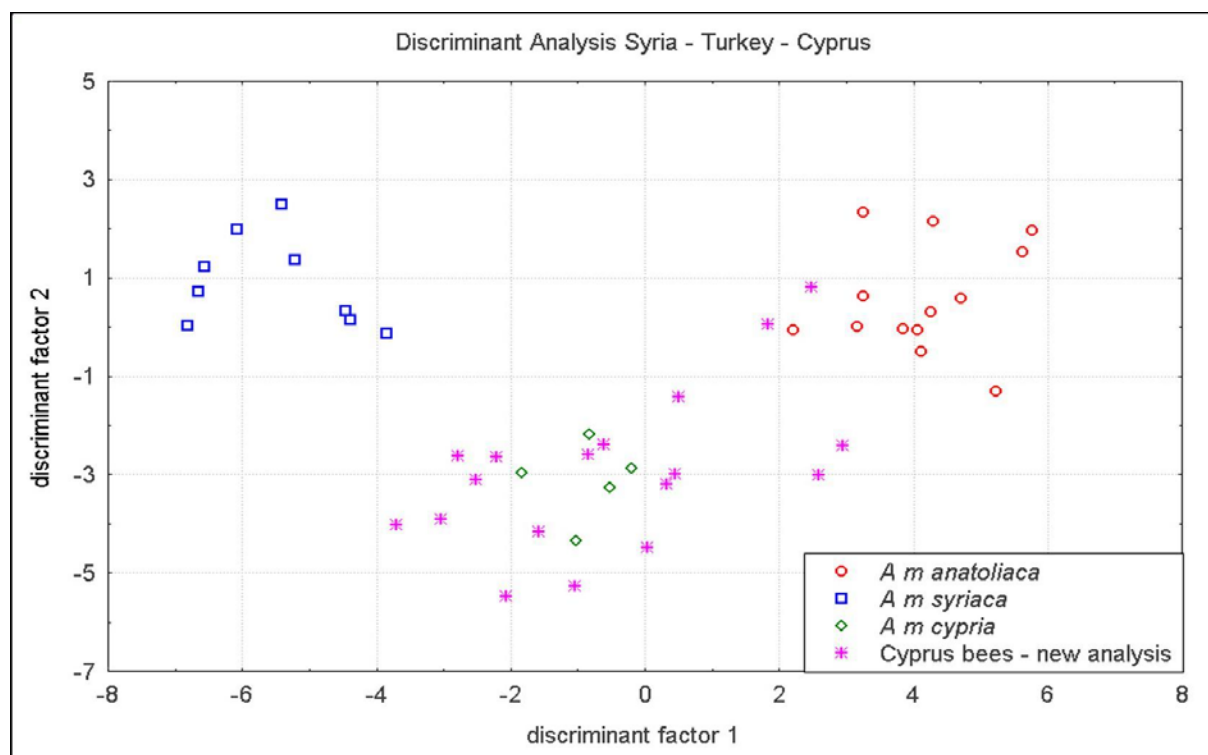


Figura 1 – Analiza factorială a *A. m. anatoliaca*, *A. m. syriaca*, *A. m. cyprica* (mostre de referință provenite de la Oberursel) și mostre din nordul Ciprului.

## mtADN

**Regiunea CO-I:** Restricția regiunii COI cu enzima de restricție *Hinf I* nu a produs nici un fragment de restricție. Toate coloniile prezentau același tip de fragment nedigerat pe gel de agar, ca și linia C din estul Mediteranei.

**Regiunea Cyt B:** Digerarea acestei regiuni a dus la apariția a două fragmente, ceea ce reprezintă un sit de diagnostic pentru albinele melifere europene. Toate coloniile din Cipru prezintă acest sit, indicând, ca atare, că fac parte din linia C a mtADN.

**Regiunea COI-COII:** În această regiune nu a fost identificată nici o variație genetică. Produsul amplificat cu PCR a arătat că această regiune constă numai din secvența Q, cazul tuturor liniilor C. Digestia cu enzima de restricție *Dra-I* nu a produs nici o variație. Toate prezintă același tip de profile de digestie restrictivă.

**Secvențierea ND2:** Gena ND2 din ADN-ul mitocondrial a fost secvențiată în ambele direcții, folosind primarele ILE și L1. Un total de 650 bp lizibili a fost combinat cu alte secvențe ND2, depozitate în banca de gene, și a fost utilizat în analiza filogenetică. Trei "clusteri" principali au fost vizualizați în arborele filogenetic construit prin Neighbor Joining. Liniile A, C și M au fost distinse cu claritate, iar linia O a fost inserată în linia A. Dintre aceste linii, coloniile din Cipru au fost plasate în linia C (Figura 2).

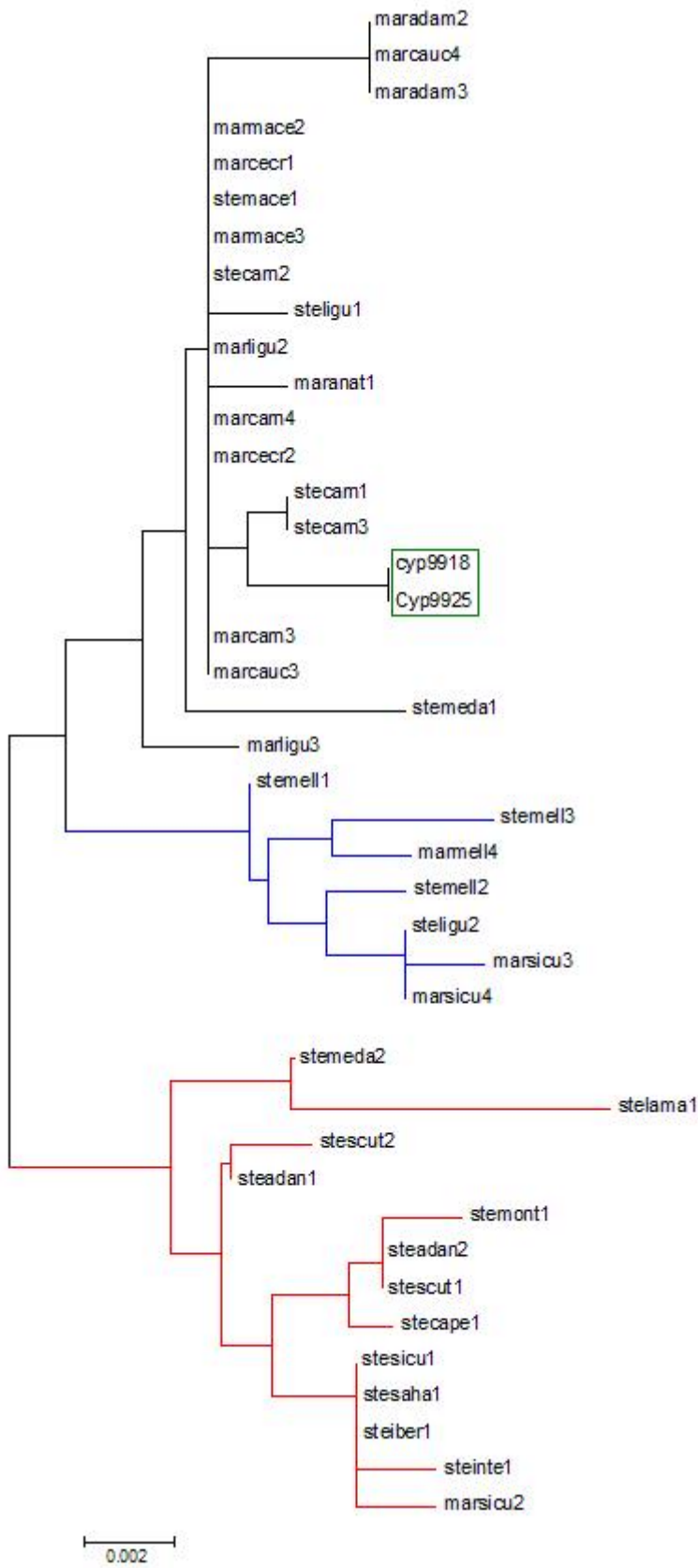


Figura 2 – Un arbore NJ prezumtiv, prezentând raportul filogenetic dintre albinele din nordul Ciprului și celelalte subspecii de albine melifere, bazat pe o replicare de 1000 (negru – linia C; albastru – linia M și roșu – linia A).

## Discuții

### Morfometrie

În cele mai multe cazuri, alocarea clară a albinelor din nordul Ciprului la mostrele clasificate ca *A. m. cyprica* în colecția de referință a rezultat din analiza morfometrică (Figura 1). Albinele din nordul Ciprului formau un "cluster" cu subspeciile din linia O, după cum era de așteptat. Un nou set de albine a arătat că albinele din Cipru continuă să-și mențină structura morfometrică, anticipând efectul recente introduceri, așa cum s-a putut observa din analiza factorială (Figura 1). Printre albinele colectate din partea de vest a Ciprului (livezi de citrice), au existat câteva colonii mai apropiate de *A. m. anatoliaca*, fapt deloc surprinzător. Numai trei dintre mostre – toate provenind din stupine moderne – au fost abordate în analiză ca *A. m. anatoliaca*, fiind probabil o urmare a coloniilor importate în nordul Ciprului de pe continent. Ca atare, din aceste rezultate se poate desprinde concluzia că populația de albine a insulei se găsește încă, într-o mare măsură, în forma originală. De asemenea, din analiză se poate observa că *A. m. cyprica* este mai asemănătoare cu *A. m. syriaca* și *A. m. anatoliaca* decât cu *A. m. adami* și *A. m. meda*.

### Alozime

Analiza morfometrică a evidențiat că regiunea de vest din nordul Ciprului a fost influențată de introducerile recente. Astfel, noile prelevări de mostre pentru detectarea variației biochimice la albinele din nordul Ciprului au fost efectuate mai ales în zona muntoasă.

Totuși, nu există o mare variabilitate la albinele din nordul Ciprului, așa după cum era de așteptat la o subspecie insulară. În plus, această zonă nu este poluată de gene nou introduse, un alt motiv al nivelurilor scăzute de heterozigotitate în zona muntoasă. Dimpotrivă, a fost evidențiată o diferențiere genetică scăzută (valoarea  $F_{st}$  este de 0,038) în rândul populațiilor din zonă. În ceea ce privește sistemul de enzime *Hk* și *Est*, populațiile sunt eterogene. Prezența unor niveluri reduse de variabilitate ar putea reprezenta un alt sprijin în favoarea morfometriei, în ceea ce privește menținerea unui statut original al albinelor din Cipru.

### mtADN

Toate mostrele din Cipru au prezentat același profil de mtADN, ceea ce dovedește în mod clar că fac parte din linia mitocondrială C. Toate tipurile diferite de analiză mitocondrială (digestia cu citocrom B a regiunii Bgl II, digestia cu carboxiloxidază I a regiunii *Hinf*, digestia regiunii *COI-COII* și *Dra-I*) au concurat la această concluzie. În majoritatea analizelor, albinele din Cipru sunt foarte asemănătoare cu subspeciile vecine din Siria și Turcia, în timp ce populațiile din aceste țări prezintă o variabilitate mult mai mare. De asemenea, rezultatul analizei secvențiale a regiunii ND2 a evidențiat că mostrele de *A. m. cyprica* fac parte din linia C, deși morfometric se încadrează în linia O.

### Mulțumiri

Autorii adresează mulțumiri Prof. Dr. Inci Togan și prof. Dr. Zeky Kaya, pentru sprijinirea analizelor alozimice efectuate în laborator. Lucrarea de față a fost sprijinită prin donațiile acordate Dr. Sheppard și parțial (din fonduri ZKU) Dr. Kandemir.

## BIBLIOGRAFIE

- Adam, B. (1983), In search of best strains of honeybees. 2<sup>nd</sup> Edition, Northern Bee Books, UK. 206p
- Arias M.C., Sheppard W.S. (1996), Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phyl. Evol.* 5, 557–566
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. (1993), A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., *Experientia* 49, 1016–1021
- Kandemir I., Kence A. (1995), Allozyme variability in the central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) populations, *Apidologie* 26, 503–510
- Meixner M.D., Meixner A. (1997), Bee morphometric. Version 1.02
- Ruttner F. (1988), Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. (1978), Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381

- Ruttner, F. (1988), Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Swofford D.L., Selander R.B. (1981). "BIOSYS-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics" *The Journal of Heredity*, 72, 281-283
- Sheppard W.S., Arias M.C., Shimanuki H. (1994), "Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)" *Bull. Entomol. Res.*, 84, 551-554